

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MULTIPLA SKLEROZA: TEMELJNE ZNAČAJKE I
MEHANIZAM NASTANKA

MULTIPLE SCLEROSIS: BASIC FEATURES AND
UNDERLYING DISEASE MECHANISM

SEMINARSKI RAD

Petra Niži

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2011.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
2. KLINIČKE I BIOLOŠKE ZNAČAJKE MULTIPLE SKLEROZE	3
2.1. Oblici multiple skleroze i simptomi bolesti	5
3. ETIOLOGIJA MULTIPLE SKLEROZE.....	6
3.1. Genetske predispozicije.....	8
4. MEHANIZAM OŠTEĆENJA CNS-a (MIJELINA, OLIGODENDROCITA I AKSONA) U MULTIPLOJ SKLEROZI.....	10
4.1. Indukcijska i efektorska faza autoimune reakcije u EAE/MS.....	12
4.1.1. Probijanje krvno-moždane barijere	14
4.2. Mehanizam ozljede neurona i aksona u MS.....	17
5. ZAKLJUČAK	18
6. LITERATURA.....	19
7. SAŽETAK.....	21
8. SUMMARY	22

1. UVOD

Multipla skleroza (lat. *Sclerosis multiplex, Encephalomyelitis disseminata*, MS) je upalna demijelinizacijska bolest središnjeg živčanog sustava (CNS-a) koja je glavna manifestacija nastanka skleroza (lezija, plakova) u CNS-u koje su rezultat gubitka mijelinske ovojnice oko aksona neurona, ali i oštećenja samih demijeliniziranih aksona. Javlja se s priličnom učestalošću (1/1000 ljudi), dvaput češće u žena nego muškaraca i to uglavnom između dvadesete i tridesetpete godine života.

Većina oboljelih od MS-e živi još nekoliko desetljeća (tridesetak godina i više) nakon dijagnoze s uglavnom normalnom radnom sposobnošću, a procjenjuje se da bolest skraćuje očekivani životni doba za oko deset godina. Razvoj simptoma razlikuje se u oboljelih; simptomi se javljaju povremeno i s razvojem bolesti mogu se mijenjati u jakosti i trajanju. Prema tijeku bolesti razlikuju se četiri oblika MS-e.

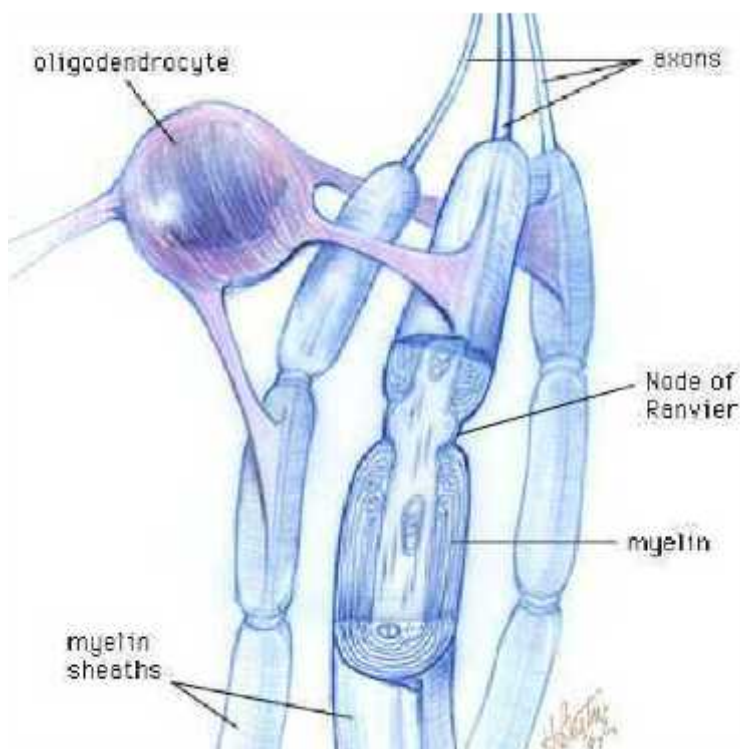
Lezije koje nastaju u MS-i posljedica su djelovanja autoreaktivnih imunskih stanica koje se infiltriraju u mozak prelaze i krvno-moždanu barijeru, zbog čega se MS smatra autoimunskom bolešću, no nije dokazano je li infekcija specifičnim virusom okida takve autoreaktivnosti ili se ona javlja zbog drugih uzroka.

Dakle, uzrok multiple skleroze još uvijek nije poznat, no pretežno se smatra da je bolest uzrokovana udruženim djelovanjem više čimbenika: genetskom predispozicijom, izloženosti virusu/ima u djetinjstvu (sporo djeluju i virus koji ostaje mnogo godina latentan u organizmu uz povremene manifestacije) i okolinom (alergijska zbivanja u organizmu). Zanimljivo je da je bolest češća u zemljama koje su smještene između 40. i 65. stupnja sjeverne geografske širine, a na Dalekom istoku i tropima je vrlo rijetka te da se više javlja u sterilnim zemljama. Oboje govori u prilog pretpostavci da je infekcija nekim virusom jedan od glavnih pokretača ove bolesti, uz činjenicu da se u krvi oboljelih često nađu povišene razine antivirusnih protutijela, no do danas još uvijek nije otkriven specifičan virus povezan s razvojem MS-e (Demarin i sur., 2000).

Cilj ovog rada je ukratko prikazati temeljne kliničke i biološke značajke multiple skleroze, dati pregled pretpostavljene etiologije bolesti te trenutno uvida o mehanizmu demijelinizacije i oštećenja aksona neurona središnjeg živčanog sustava.

2. KLINIČKE I BIOLOŠKE ZNAČAJKE MULTIPLE SKLEROZE

Mnogi aksoni neurona mozga i leđne moždine su mijelinizirani, odnosno obavijeni mijelinskom ovojnicom koju oko aksona tvore stanice oligodendrociti, stvaraju i segmente ovojnice, pri čemu jedan oligodendrocit sudjeluje u stvaranju više mijelinskih ovojnica različitih aksona (Slika 1).



Slika 1. Oligodendrociti u CNS-u grade mijelinsku ovojnicu oko aksona. (Preuzeto iz Johnston i Joy, 2003)

Mijelinska ovojnica oko aksona ima funkciju izolatora koji omogućuje vrlo brzo provođenje akcijskog potencijala. Naime, natrijski kanali regulirani naponom koji se otvaraju kada je neuron podražen (uzrokuju i depolarizaciju) postoje samo na golim područjima aksona između segmenata mijelinske ovojnice (tzv. Ranvierovi čvorovi, suženja), dok su na područjima aksona obavijenim mijelinom pretežno prisutni kalijevi kanali (koji se otvaraju izazivaju i repolarizaciju) što ima posljedicu brzog skokovitog prijenosa akcijskog potencijala od jednog Ranvierovog suženja do drugog kroz mijelinizirani akson.

U multiploj sklerozi dolazi do demijelinizacije aksona, ali i oštećenja samih demijeliniziranih aksona, tijela neurona i samih oligodendrocita što je rezultat napada od strane autoreaktivnih imunokompetentnih stanica, a ima kao posljedicu usporenje ili potpuni

prestanak provođenja akcijskih potencijala kroz aksone, time se gubi poslana informacija te se otkriva kao klinički deficit, odnosno javljaju se različiti simptomi bolesti. Simptomi se javljaju povremeno i nisu predvidljivi, ali su povezani s mjestom nastanka demijelinizirane lezije u CNS-u, iako postoje i "tihe" lezije koje ne daju simptome. U području oštećenog mijelina povećava broj i veličina astrocita, stanica koje normalno podupiru i hrane neurone u mozgu. Takav obimni rast astrocita na mjestu oštećenja naziva se gliozna i odgovoran je za nastanak ožiljka (plaka). U mozgu oboljele osobe postoje dva tipa lezija; stabilne lezije koje ne pokazuju znakove upalnog procesa (nastale vremenski ranije) te aktivne ili kronične lezije koje su trenutna žarišta upalnog procesa demijelinizacije i oštećenja aksona (Johnston i Joy, 2003).

Za sigurnu potvrdu dijagnoze ove bolesti koristi se skeniranje mozga tehnikom magnetske rezonance koja otkriva nastale plakove na mozgu, a također se analizira i cerebrospinalna tekućina (CSF) uzeta punkcijom iz lumbalne moždine. Brojni različiti biljezi bolesti u tijeku razdoblja aktivne demijelinizacije se javljaju u CSF, iako ne svi u svih oboljelih, primjerice antiviralna antitijela, različiti citokini i citokinski receptori, adhezijske i kostimulatorne molekule, IgG i IgM, T limfociti, mijelinski bazični protein (MBP, komponenta mijelina), metaloproteinaze (bitne za prodor stanica kroz krvno moždanu barijeru), gliotoksin (citotoksičan za oligodendrocite i astrocite) i mnogi drugi (Johnston i Joy, 2003).

Kad se proteini cerebrospinalne tekućine oboljelih razdvoje gel elektroforezom, javljaju se pojedini bendovi konstantni tijekom bolesti za određenu oboljelu osobu; takvi se bendovi nazivaju oligoklonalni, a predstavljaju jedan tip protutijela proizveden od strane određene klonalno limfocita B što potvrđuje sudjelovanje i humoralne imunosti (u jednom dijelu pacijenata humoralna imunost igra ključnu ulogu, o čemu će riječi biti kasnije). Pomoću metode *phage display library* pokušava se otkriti antigen na koji nastaju takva specifična protutijela u oboljelih osobama, no dosad bez jednoznačnih rezultata (Govarts i sur., 2007).

Na ovom primjeru možemo se zapitati: da li naša protutijela predstavljaju imunostni odgovor na infektivni agent poput virusa koji se povremeno manifestira i uzrokom je MS-e, ili se jednostavno radi o proizvodu autoreaktivnih B limfocita; odnosno postavlja se pitanje uzroka ove bolesti.

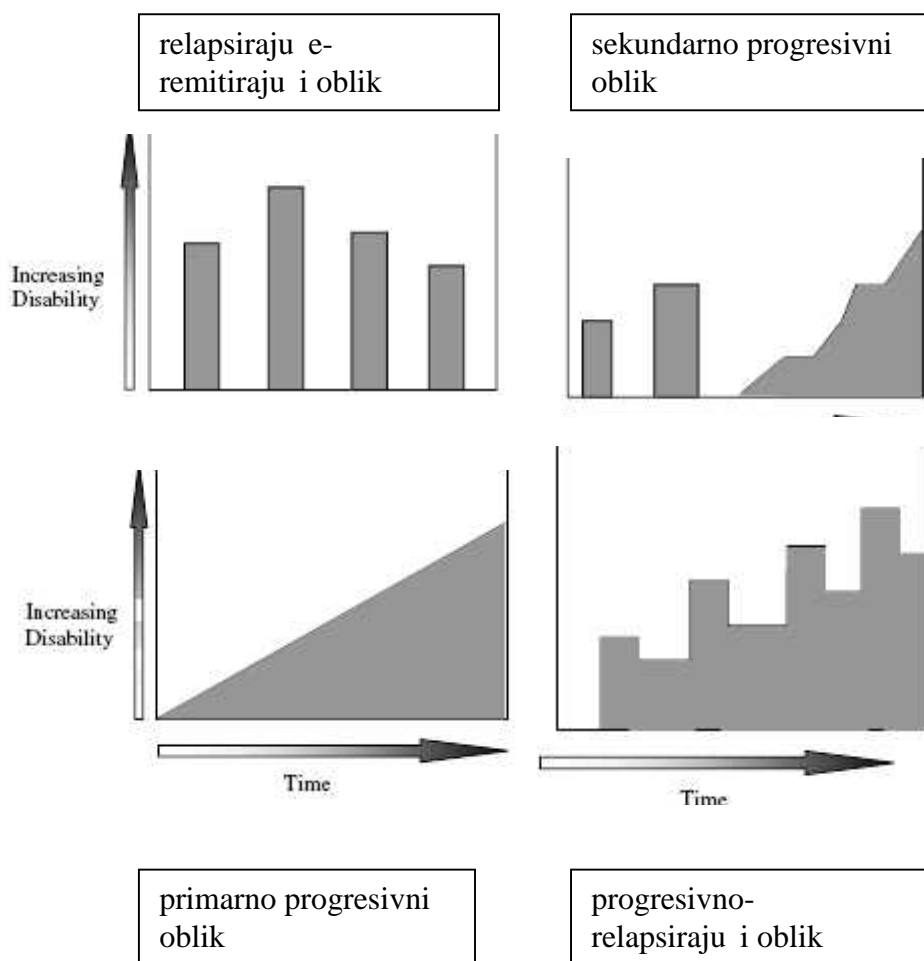
2.1. Oblici multiple skleroze i simptomi bolesti

U većine bolesnika (85%) bolest započinje kao relapsirajuće-remitirajuće i oblik, pri čemu dolazi do faza pogoršanja (relapsa, šubova, akutnih napada) otkrivenih pojavom nekih od simptoma bolesti, ovisnih o mjestu demijelinizacije u CNS-u (mučnjenje vida jednog oka, obamrlost ili trnci u nekom dijelu tijela, gubitak koordinacije, motoričko slabljenje dijela tijela, poteškoće u hodanju, nemogućnost kontrole mokraćnog sfinktera, kognitivne poteškoće, bol i drugi). Razdoblja relapsa traju jedan do tri mjeseca i prateća su razdobljem remisije u kojima se stanje bolesnika vraća na ono koje je postojalo prije pogoršanja bolesti ili može zaostati određeno manje oštećenje (Demarin i sur., 2000).

Molekularna osnova remisije, odnosno oporavka nakon relapsa je remijelinizacija aksona do koje dolazi stvaranjem nove mijelinske ovojnice od strane novih oligodendrocita nastalih iz progenitorskih matičnih stanica oligodendrocita što daje mogućnost remijeliniziranim aksonima da ponovo provode akcijske potencijale. Uloga različitih stanica u mozgu u procesu remijelinizacije je trenutni predmet istraživanja na čemu bi se svakako trebalo intenzivnije poraditi zbog mogućeg razvoja potencijalne strategije za liječenje bolesti. Ukoliko dođe do oštećenja samih aksona i izraženog smanjenja broja i veličine oligodendrocita, više nema remisija nakon relapsa već se bolest razvija u sekundarno progresivni oblik (oko 50% bolesnika s relapsirajućim-remitirajućim oblikom ga razvije). U takvom obliku postoji kontinuirana progresija bolesti s kratkim razdobljima stabilizacije.

Rijetko, javlja se primarno progresivni oblik sa stalnom progresijom od početka bolesti što je popraćeno gubitkom određenih sposobnosti i progresivno-relapsirajućim oblikom kad se bolest progresivno pogoršava od samog početka uz veću akutna pogoršanja s ili bez oporavka na stupanj prije relapsa (Demarin i sur., 2000). Shematski prikaz oblika multiple skleroze prikazan je Slikom 2.

Postojanje više oblika multiple skleroze, s obzirom na tijek razvoja bolesti i različite simptome koji s različitom ozbiljnošću pogađaju oboljele, govore o utjecaju genetskih predispozicija CNS-a same osobe za podložnost napadu autoimunih stanica. Također se postavlja pitanje o mogućnosti postojanja različitih uzroka bolesti budući da je i sam mehanizam upalne demijelinizacije drugačiji u skupini ljudi oboljelih od MS. U jednojajanih blizanaca oboljelih od MS tijekom bolesti može biti izrazito različito što svjedoči o ulozi okolišnih imbenika u njenom razvitku (Johnston i Joy, 2003; Lassmann, 2005).



Slika 2. Oblici multiple skleroze s obzirom na progresiju bolesti u vremenu. (Preuzeto i prilagođeno iz Johnston i Joy, 2003)

3. ETIOLOGIJA MULTIPLE SKLEROZE

Multipla skleroza se smatra autoimunom upalnom bolešću u koja je uzrokovana s više međusobno neisključivih čimbenika, kao što su okolišni i infektivni čimbenici u genetski predisponiranim pojedincima. Većina ljudi ima u krvotoku i perifernom limfnom sustavu potencijalno autoreaktivne limfocite s receptorima specifičnim za vlastite antigene koji su normalno zaštićeni od kontakta s limfocitima (kao što su antigeni CNS-a), ali su takvi limfociti u zdrave osobe "obuzdani" nekim od mehanizama njihove supresije, primjerice pomoću regulatornih T limfocita (Gold i sur., 2006). Tako je pokazano da autoreaktivni, zabranjeni pomoćni limfociti T_H s receptorom specifičnim za potencijalni autoantigen u MS, mijelinski bazični protein, postoje podjednako u zdravih osoba i osoba oboljelih od multiple skleroze, ali je razlika u tome što su kod oboljelih ti limfociti senzibilizirani na autoantigen i mogu prodrijeti kroz krvno moždanu barijeru (Donati i Jacobson, 2002). Ne zna

se to na koji su autoantigen senzibilizirani autoreaktivni limfociti T_H1 (glavni posrednici napada na mijelin), no potencijalni kandidati za autoantigen su ve spomenuti mijelinski bazi ni protein (MBP) i drugi proteini mijelina – proteolipidni protein (PLP), glikoprotein mijelina (MAG) i mijelinski oligodendrocitski glikoprotein (MOG).

Pitanje uzroka multiple skleroze je zapravo pitanje na ina aktivacije autoreaktivnih limfocita, naravno uzimaju i u obzir da je osoba genetski predisponirana. Predloženo je nekoliko mogu ih mehanizama koji okidaju autoimunu reakciju na mijelin: molekularna mimikrija, aktivacija promatra a (engl. *bystander activation*) i širenje epitopa, te prisustvo superantigena (Johnston i Joy, 2003). Molekularna mimikrija je mehanizam kojim bi neki infektivni agent (virus ili bakterija) mogao uzrokovati imunosnu križnu reakciju s mijelinskim proteinima. Naime, do molekularne mimikrije dolazi ukoliko je neki bakterijski ili virusni epitop sli an nekom vlastitome epitopu; nakon infekcije takvim patogenom do e do razvoja specifi ne imunoreakcije, odnosno do nastanka senzibiliziranih limfocita specifi nih za epitop patogena, ali i za vlastiti epitop koji mu nalikuje. U prilog molekularnoj mimikriji govori pokazana reaktivnost klonova limfocita T specifi nih za mijelinski bazi ni protein prema nekim peptidima karakteristi nim za grupu herpesvirusa (*Epstein-Barrov virus*, *Herpes simplex virus*, citomegalovirus, virus gripe, papilomavirus) (Lassmann, 2005). Drugi mogu i na in na koji bi infekcija patogenom bila okida autoimunosti u MS je tzv. aktivacija promatra a. Nakon infekcije virusom dolazi do pokretanja specifi ne imunoreakcije koja uklju uje proizvodnju brojnih citokina i kemokina, mogu e ošte enje normalnog tkiva pri upalnoj reakciji s posljedicom otkrivanja ina e skrivenih autoantigena (kao što su antigeni CNS-a) ili pak može do i do ekspresije doma inskih ina e utišanih gena. Ovakvi doga aji zatim mogu izazvati aktivaciju "promatra kih" limfocita specifi nih za izloženi autoantigen što vodi upalnoj autoimunoj reakciji na mijelin uz posljedi no neprestano otkrivanje novih epitopa autoantigena rezultiraju i aktivacijom i drugih limfocita i progresijom bolesti (takozvano širenje epitopa). Ovakav mehanizam predložen je za nastanak brojnih autoimunih bolesti. U literaturi se spominje i prisustvo superantigena kao mogu eg okida a MS-e koji nespecifi no aktivira oko 15% svih prisutnih pomaga kih T limfocita, a time i potencijalne autoreaktivne klonove (Johnston i Joy, 2003; Lassmann, 2005).

Uzimaju i u obzir heterogenost oblika multiple skleroze javio se i koncept multiple skleroze kao bolesti s heterogenim etiološkim mehanizmima koji predlaže da razli iti procesi – ili autoimunost ili povremeno manifestirana virusna infekcija - mogu biti njenim uzrokom u pojedinih osoba. Ovakvom konceptu u prilog ide istraživanje koje je pokazalo da su mehanizam demijelinizacije i cilj ošte enja (mijelinska ovojnica ili oligodendrociti) razli iti u

oboljelih (Lucchinetti i sur., 2000). Naime, naeno je da postoje etiri razliita uzorka demijelinizacije (iako sa zajedni kom karakteristikom infiltriranih T limfocita, makrofaga i aktiviranih mikroglija stanica). Pregled karakteristika ova etiri razliita uzorka demijelinizacije su u Tablici 1. Uzorak demijelinizacije bio je isti za sve aktivne lezije oboljele osobe, no ispitivani oboljeli nisu bili u istom stupnju progresije bolesti. Uzorak 2 govori o ulozi humoralne imunosti u dijela oboljelih.

Tablica 1. Karakteristike etiri uzorka demijelinizacije aktivnih lezija u MS.

uzorak demijelinizacije	karakteristike aktivne lezije
Uzorak 1	perivenska distribucija lezija, cilj ošte enja : mijelin, infiltrirani T limfociti i aktivirani makrofagi, aktivirane mikroglija stanice
Uzorak 2	perivenska distribucija lezija, cilj ošte enja : mijelin, infiltrirani T limfociti i makrofagi, aktivirane mikroglija stanice, depozit IgG i C9 komponente komplementa
Uzorak 3	djelomi no o uvani mijelin uz upaljenu žilu; ošte enje na rubovima lezije, cilj ošte enja : oligodendrociti (znakovi apoptoze) i mijelin, osobiti gubitak MAG (glikoprotein mijelina), a ne drugih mijelinskih proteina, infiltrirani T limfociti i makrofagi, aktivirane mikroglija stanice
Uzorak 4	perivenska distribucija lezija, cilj ošte enja : mijelin i oligodendrociti, gubitak više mijelinskih proteina (MAG, MBP, PLP, MOG), infiltrirani T limfociti i makrofagi, aktivirane mikroglija stanice

(Prilago eno iz Lucchinetti i sur., 2000.)

Zaklju ak ovih saznanja je da terapija koja bi lije ila bolest u jedne osobe, ne mora nužno pomo i drugoj oboljeloj osobi te da uspješnost terapije ovisi i o stupnju progresije bolesti. Dakle, potrebno je prilaziti istraživanjima terapijskih strategija s naglaskom na individualnost oboljelog, odnosno razli itost kojom se bolest manifestira što dakako dodatno komplicira pronalazak zadovoljavaju e terapije za lije enje.

3.1. Genetske predispozicije

Multipla skleroza nije nasljedna bolest u klasi nom smislu budu i da se ne prenosi s jedne generacije na drugu, ali postoji odre ena nasljedna sklonost razvijanju bolesti. Pove ani

rizik za razvoj bolesti imaju članovi obitelji oboljele osobe, iako 80% oboljelih nema bližeg ili daljeg člana obitelji pogođenog multiplom sklerozom. Vjerojatnost pojavnosti MS u jednoj od anih blizanaca je 25-30% što svjedoči o kompleksnoj ulozi gena u javljanju bolesti (Demarin i sur., 2000). Dosadašnja genetička istraživanja su pokazala da genetička podložnost pojedinca za MS pridonosi više gena (nisu još svi utvrđeni), svaki umjerenim efektom, s time da se ne radi o mutiranim, defektnim genima, već normalnim varijantama određenih gena (određenim alelima) (Hafler i sur., 2007). U više istraživanja pretraživanja genoma obitelji sjevernoeuropske pripadnosti pogođenih MS pokazano je da je genetska regija povezana s podložnošću za razvoj bolesti HLA-II (engl. *human leukocyte antigen*) lokus koji se nalazi na kratkom kraku kromosoma 6. Pokazano je da je najvažniji gen tog lokusa koji pridonosi podložnosti za multiplu sklerozu HLA-DR2 gen. Taj gen je jedna od varijanti gena za lanac HLA-DR molekule (MHC-II molekule) prisutan u dijelu ljudske populacije, a vjerojatnost razvitka multiple skleroze u osobe koja ga posjeduje je 1/250. Budući da taj gen kodira za molekulu koja je antigen prezentirajuća, napravljene su kristalografske studije kako bi se utvrdilo moguće postojanje nekovalentne biokemijske mehanizacije potencijalnog autoantigena, mijelinskog baznog proteina, s antigen-vezujućom domenom HLA-DR2. Istraživanja su pokazale da aminokiseline 89-98 mijelinskog baznog peptida "sjedaju" u hidrofobni džep antigen-vezujuće domene HLA-DR2, omogućavajući predodavanje ovog antigena limfocitima T u ovako genetski predisponiranoj osobi (Johnston i Joy, 2003). Ovdje postoji genetički prilog konceptu multiple skleroze kao bolesti s heterogenom patologijom, budući da postoje istraživanja koja pokazuju odsustvo HLA-DR2 alela u nekih oboljelih, i štoviše, u oboljelih koji pripadaju određenim etničkim grupama (takozvana "azijska" multipla skleroza nije povezana s HLA-DR2 alelom).

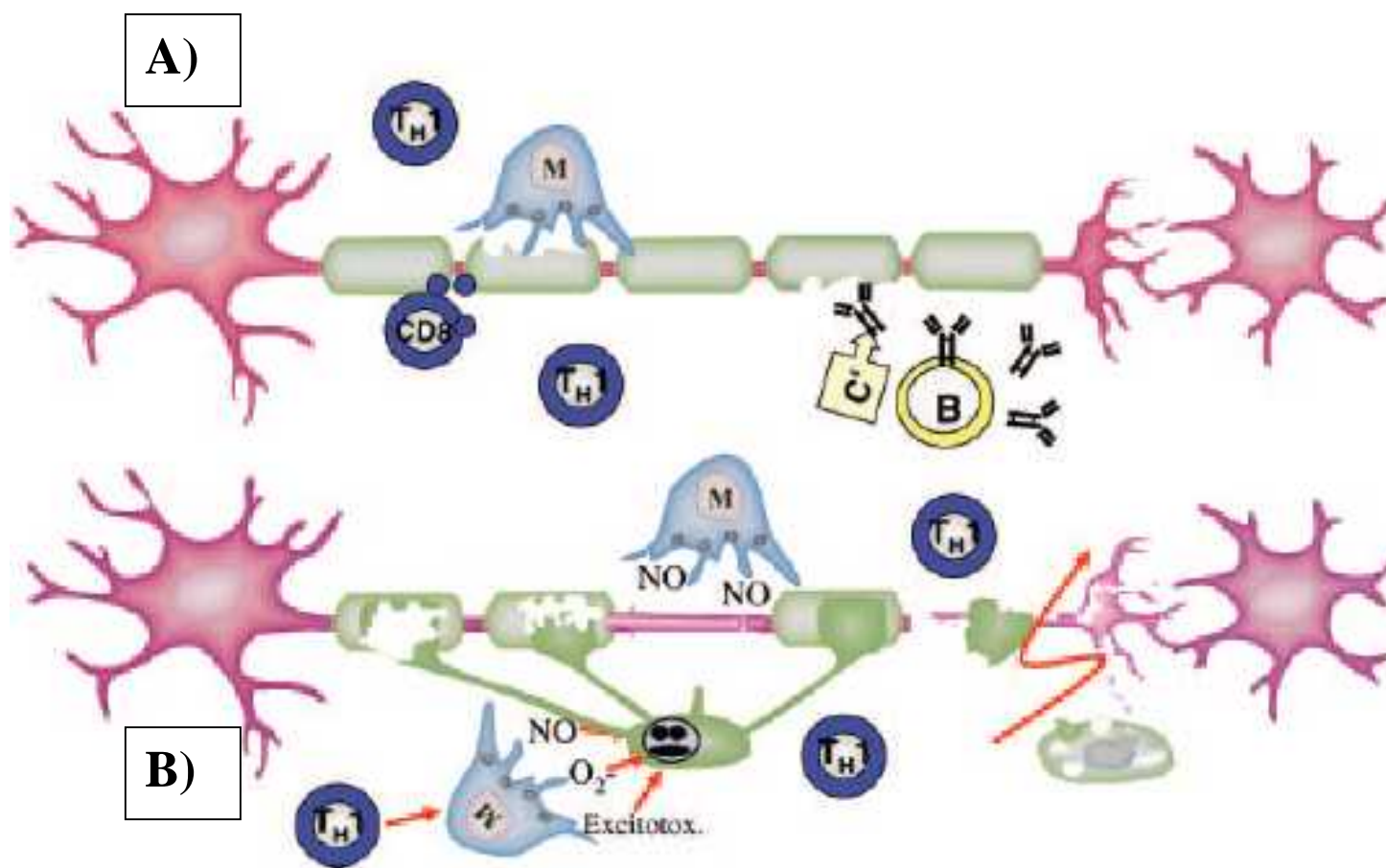
U novijim istraživanjima pokazano je da su i određene alelne forme gena za α lanac receptora za interleukin 2 (IL-2RA) i receptora za interleukin 7 (IL-7RA) također povezane s podložnošću pojedinca za razvoj multiple skleroze, iako s manjim učinkom u odnosu na HLA-DR2 gen (Hafler i sur., 2007). Uloge ovih alelnih formi u razvoju bolesti još moraju biti istražene.

Proučavajući literaturu, jasno je da je nedovoljno istražena veza između različitih kliničkih oblika MS i gena za podložnost razvoju bolesti, kao i moguća veza specifičnih gena koji bi ušli u mehanizaciju nastanka multiple skleroze, što bi svakako trebao biti jedan od ciljeva daljnjih istraživanja.

4. MEHANIZAM OŠTE ĆENJA CNS-a (MIJELINA, OLIGODENDROCITA I AKSONA) U MULTIPLOJ SKLEROZI

Mnoga saznanja o mehanizmu nastanka ošte Ćenja CNS-a u multiploj sklerozi dolaze iz istraŹivanja na animalnom modelu izazvane autoimunosti - eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (kratica EAE), iako ta bolest ne odgovara patofizioloŹki u potpunosti multiploj sklerozi zbog velike heterogenosti pojavnosti MS-e, o Ćemu je ve Ćilo rije i. Pokazano je da senzibilizacijom genetski podloŹnih miŹeva i Źtakora s nekim od mijelinskih proteina (MBP, MAG, MOG, PLP) u kompletnom Freundovom adjuvansu dolazi do razvoja EAE s brojnim klini kim, neuropatoloŹkim i imunoloŹkim zna ajkama multiple skleroze. Mogu nost adoptivnog prijenosa bolesti iz EAE-Źivotinje u zdravu Źivotinju pokazala je da su glavni nosioci po etka i nastavka napada na mijelin u EAE autoreaktivni pomaga ki limfociti T_H (Gold i sur., 2006).

U multiploj sklerozi, svi uzorci (1-4) demijelinizacije u aktivnim lezijama sadŹavali su infiltrirane T limfocite i makrofage (Lucchinetti i sur.), Źto je u skladu s EAE modelom. U EAE modelu se prisustvo humoralne imunosti dobilo senzibilizacijom genetski podloŹne Źivotinje s mijelinskim oligodendrocitskim glikoproteinom (MOG) koji je dakle, uz pojavu senzibiliziranih T stanica, izazvao i pojavu protutijela koja su pridonijela ozbiljnijoj demijelinizaciji u CNS-u senzibiliziranih Źivotinja (Gold i sur., 2006). Doprinos demijelinizaciji od strane protutijela koja se veŹu na oligodendrocite i mijelin u upalnoj akutnoj leziji daju uobi ajeni mehanizmi imunosnih reakcija posredovanih protutijelima: poja ana fagocitoza od strane infiltriranih aktiviranih makrofaga, poticanje stani ne citotoksi nosti posredovane protutijelima te aktivacija komplementa (Źto tako er doprinosi fagocitozi zbog nastanka opsoninskih ulomaka, osloba a kemotakti ke ulomke komplementa Źto privla i druge imunosne stanice, osloba a ulomke komplementa koji doprinose daljnjem razvoju upalne reakcije). Takav model EAE u skladu je s uzorkom 2 demijelinizacije u MS (Lucchinetti i sur.), a dokazi iz imunopatoloŹkih istraŹivanja pokazuju da su mehanizmi ovisni o protutijelima i komplementu uklju Ćeni u oko 60% slu ajeva multiple skleroze. Tako er se u brojnim lezijama Ćesto nalazi obimno prisustvo CD8⁺ citotoksi nih limfocita koji bi mogli doprinositi oŹte Ćnju citotoksi nom reakcijom ovisnoj o perforinima i granzimima u direktnoj me ureakciji s autoantigenom mijelina izloŹenim preko MHC - I molekule (Gold i sur., 2006). Slika 3 pokazuje mogu Će izvrŹne mehanizme od strane infiltriranih imunokompetentnih stanica koji rezultiraju oŹte Ćenjem u CNS-u.



Slika 3. Mogući mehanizmi razaranja u aktivnoj leziji CNS-a. (Preuzeto i prilagođeno iz Gold i sur., 2006)

Kratice: T_H1 - pomagački autoreaktivni T limfocit, M – makrofag, CD8 – citotoksični autoreaktivni T limfocit, B - B limfocit, C – aktiviranje komplementa, NO - dušikov oksid (citotoksin)

A) Na slici je prikazan lijevo citotoksični napad autoreaktivnih CD8⁺ T limfocita na mijelin u reakciji ovisnoj o perforinima i granzimima (u direktnoj mehanizmi reakciji), fagocitoza mijelina od strane aktiviranih makrofaga, a desno na slici vezanje autoprotutijela na mijelin i posljedična aktivacija komplementa.

B) Na slici je prikazano oštećenje oligodendrocita, mijelina i aksona sa citotoksičnim proizvodima aktiviranih makrofaga (aktiviraju ih autoreaktivni pomagački limfociti T_H); glavni kandidati za citotoksične proizvode koji izazivaju oštećenje su reaktivni kisikovi i dušikovi radikali (superoksidni anion, dušikov oksid).

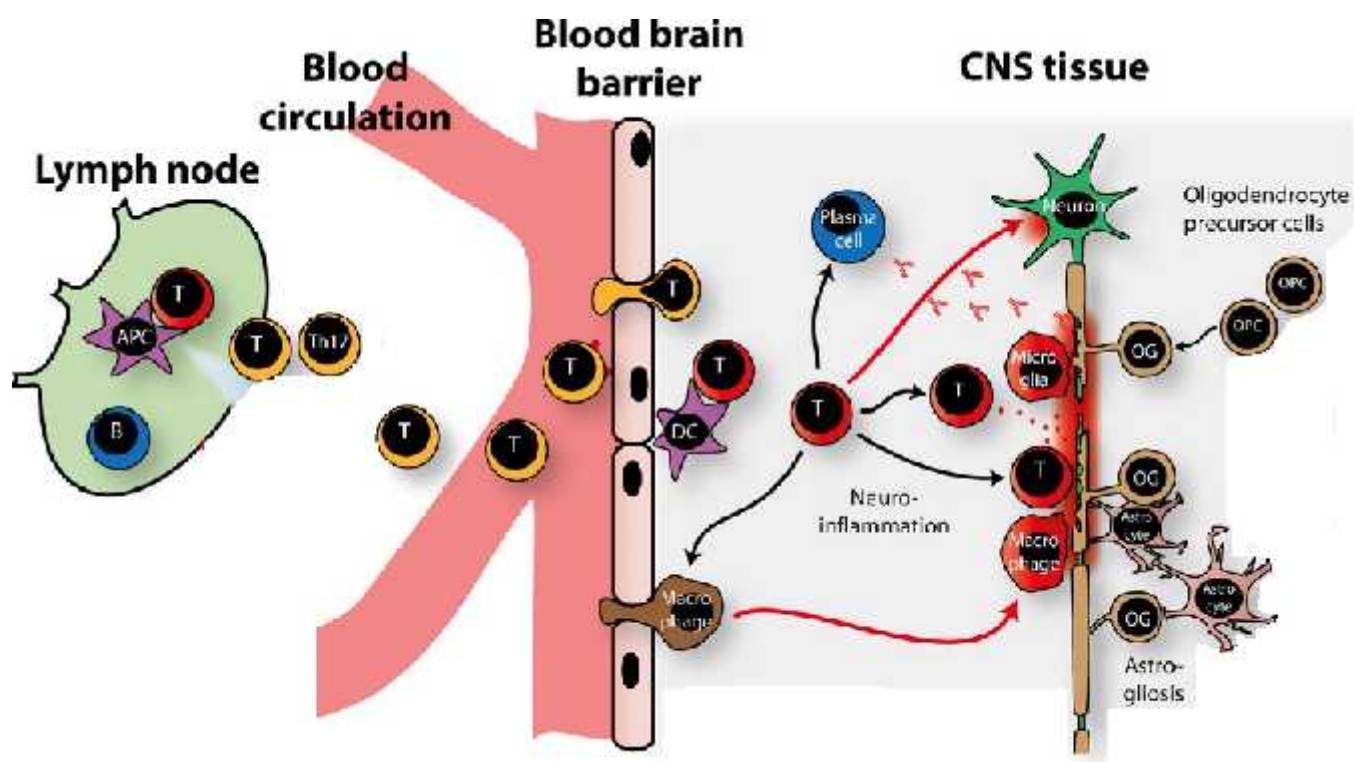
4.1. Indukcijska i efektorska faza autoimune reakcije u EAE/MS

Uz već nabrojane načine moguće aktivacije autoreaktivnih limfocita T u poglavlju o etiologiji multiple skleroze, postoje indikacije da bi se aktivacija autoreaktivnih limfocita koji normalno postoje u ljudi mogla dogoditi u oboljelih zbog poremećene funkcije regulatornih limfocita koji više ne obuzdavaju postojeće autoreaktivne limfocite (Gold i sur., 2006). U EAE modelu je pomoću razvijenih tehnika za praćenje migracije stanica otkriven daljnji tijek događaja nakon aktivacije autoreaktivnih T_H limfocita, a pretpostavlja se da je takav slijed događaja uvelike sličan i u multiploj sklerozi.

Nakon adoptivnog transfera T limfocita iz EAE životinje u zdravu životinju ili senzibilizacije životinje s nekim mijelinskim antigenom dolazi do indukcije bolesti u dvije faze, a to su inicijacijska i efektorska (izvršna) faza. U inicijacijskoj fazi dolazi do predopćavanja mijelinskih antigena specifičnim pomagačkim limfocitima T_H pomoću antigen predopćivačkih stanica u sekundarnim limfatičkim organima, s posljedičnom aktivacijom i ekspanzijom T_H1 i / ili T_H17 pomagačkih limfocita (Zepp i sur., 2011). Uloga pomagačkih T_H1 limfocita u razvoju MS je poznata od začetaka istraživanja mehanizma ove bolesti, dok je uloga nove podskupine pomagačkih limfocita T_H17 u posljednje vrijeme privukla veliku pozornost zbog moguće patogene uloge u autoimunim upalnim bolestima, među kojima je i MS. Prilog T_H17 stanica razvoju upalne reakcije daju citokini koje te stanice izlučuju, prvenstveno interleukin 17 (IL-17A), ali i IL-17F, IL-21, IL-22. Razine proupalnog citokina interleukina 17 povišene su u nizu autoimunih bolesti (kao što su MS, reumatoidni artritis, psorijaza), a njegov učinak je aktivacija različitih gena u fibroblastima, endotelnim stanicama, makrofagima, epitelnim stanicama i astrocitima koji genski proizvodi pridonose razvoju upale u efektorskoj fazi same bolesti, nakon što je već došlo do infiltracije aktiviranih limfocita T_H17 u CNS. Također je u moždanom deblu živog anesteziranog EAE miša pomoću dvofotonske mikroskopije otkriven direktni kontakt neurona i T_H17 limfocita u demijelinizacijskim lezijama koje su imale izraženu ozljedu aksona. Takva meureakcija vodi do povećanog protoka unutarstaničnog kalcija u neuronima i posljedične neuronske štete (Zepp i sur., 2011). O mehanizmima oštećenja aksona bit će još riječi kasnije.

Nakon ekspanzije autoreaktivnih T_H limfocita u sekundarnim limfatičkim organima, dolazi do njihovog probijanja krvno-moždane barijere što je detaljnije opisano u sljedećem potpoglavlju 4.1.1. Nakon prelaska krvno-moždane barijere zbiva se reaktivacija T_H limfocita u perivaskularnom prostoru pomoću meureakcije s lokalnim antigen predopćivačkim stanicama CNS-a, makrofagima i mikroglija stanicama. Ta reaktivacija T_H limfocita rezultira izlučenjem

proupalnih citokina i posljedičnom aktivacijom makrofaga i mikroglija stanica (također izluku proupalne citokine poput $\text{TNF-}\alpha$, kemokine, matriks metaloproteinaze, citotoksine, različite proteaze, reaktivne radikale dušika i kisika) što je jaki poticaj za daljnje oštećenje krvno-moždane barijere i novotvar drugih leukocita kroz već probijenu barijeru (Gold i sur., 2006). Veliki broj aktiviranih T_H stanica i drugih proupalnih stanica migrira dublje u bijelu tvar mozga što rezultira nastankom upalne lezije, odnosno dolazi do demijelinizacije, oštećenja aksona i oligodendrocita od strane imunokompetentnih stanica. Shematski prikaz ovog slijeda događaja prikazan je Slikom 4.



Slika 4. Model indukcijske i efektorske faze u EAE/ MS. (Preuzeto i prilagođeno iz Ingwersen i sur., 2011)

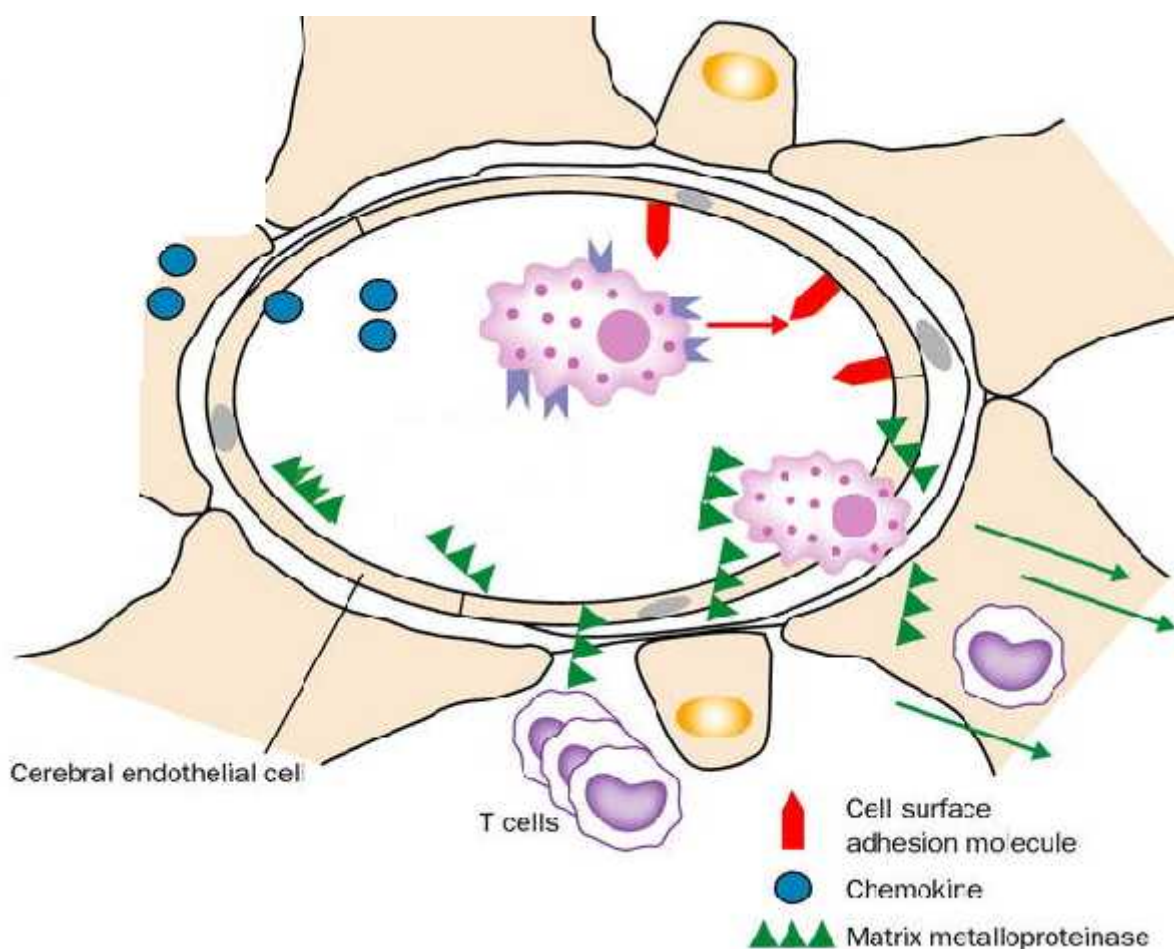
Kratice: APC – antigen predstavnika stanica, T – autoreaktivni pomoćni limfocit T, DC – lokalna predstavnika stanica, OPC – prekursorska stanica oligodendrocita, OG – oligodendrocit

4.1.1. Probijanje krvno-moždane barijere

Budu i da postoji restrikcija kretanja leukocita iz krvi u neka mjesta u ljudskom organizmu, poput CNS-a, oka i testisa, takva se mjesta smatraju imunoprivilegiranim. CNS je imunoprivilegirano mjesto zbog postojanja takozvane krvno-moždane barijere koju ine specijalno građene kapilare koje ograničavaju prijelaz krvnih stanica i razmjenu topljivih molekula između krvi i tkiva mozga. Topljive tvari prenose se iz krvi u mozak transportom pomoću endotelne stanice na endotelnim stanicama krvno-moždane barijere. Endotelne stanice krvno-moždane barijere nisu fenestrirane, ne prenose tvari pinocitozom, a međusobno su vrlo povezane pomoću proteina vrstih spojeva (engl. *tight junctions proteins*, TJs) i proteina za adheziju (engl. *adherens junctions proteins*, AJs) čime se uvelike smanjuje paracelularna propusnost. Proteine vrstih spojeva ine makromolekularni kompleksi transmembranskih proteina koji povezuju bliskom međusobno dvije susjedne endotelne stanice. U te proteine spadaju kladini, okladini, spojne adhezijske molekule te adaptorne molekule koje ih usidruju u membranama stanica: zona okcludens 1, 2 i 3, cingulin, serin-protein kinaza ovisna o kalciju. Endotelne stanice krvno-moždane barijere okružene su i poduprte stanicama pericitima te bazalnom membranom gdje vanstani ni matriks ine laminin 8 i 10, kolagen tipa IV i drugi proteini. Iza ove bazalne membrane nalazi se maleni perivaskularni prostor, a zatim je prisutna bazalna membrana moždanog parenhima koja je obložena nožnim završecima stanica astrocita koje pomažu u održavanju cjelovitosti krvno-moždane barijere te sprječavaju prodor imunosnih stanica otpuštaju i brojne topljive imbenike koji djeluju imunosupresivno, poput citokina TGF- β (Larochelle i sur., 2011).

U MS, aktivirani leukociti (autoreaktivni limfociti T, monociti, makrofagi) "probijaju" krvno-moždanu barijeru izlučivanjem proupalnih citokina i drugih topljivih imbenika poput matriks metaloproteaza i reaktivnih radikala kisika koji mogu narušiti vrste spojeve međusobno u stanicama, promijeniti proteine bazalne membrane te direktno ili indirektno djelovati na endotelne stanice krvno-moždane barijere potiču ih na proizvodnju kemokina i adhezijskih molekula (engl. *cell adhesion molecules*, CAMs) koji omogućuju privlačenje, vezanje i diapedezu aktiviranih leukocita iz krvi u parenhim mozga. Također, stanice mozga poput astrocita, mikroglija stanica i neurona aktivirane upalnim proizvodima infiltriraju ih leukocita također otpuštaju citokine koji utječu na ekspresiju gena za kemokine i stanične adhezijske molekule (CAMs) u endotelnim stanicama krvno-moždane barijere što dodatno pridonosi novom ulasku leukocita iz krvi i probijanju barijere (Larochelle i sur., 2011). Bitno je napomenuti da unatoč tome što se CNS smatra imunoprivilegiranim mjestom, infiltracija aktiviranih

leukocita u CNS se događa i za slučaj infekcije mozga nekim virusom, a čak i za popravak oštećenja u CNS-u što objašnjava navedenu sposobnost lokalnih stanica mozga da odgovore na citokinsku signalizaciju infiltriraju ih leukocita tako da potpomažu daljnje probijanje krvno-moždane barijere. Slika 5 prikazuje prijelaz imunskih stanica preko krvno-moždane barijere. U Tablici 2 navedeni su istraženi učinci citokina i drugih topljivih molekula izlučenih od strane infiltrirajućih leukocita i stanica mozga koji utječu na probijanje krvno-moždane barijere u ljudi oboljelih od MS-e (razine navedenih molekula povišene su u serumu oboljelih, osobito tijekom relapsa).



Slika 5. Prijelaz imunskih stanica preko krvno-moždane barijere. (Preuzeto i prilagođeno iz www.multiple-sclerosis.org)

Tablica 2. U inak topljivih imbenika na probijanje krvno-moždane barijere.

topljivi faktor	izvor	cilj	u inak
Citokin TNF-α	aktivirani leukociti, aktivirani mikroglija	endotelne stanice krvno-moždane barijere (BBB-ECs), periciti	indirektno smanjuje ekspresiju TJ proteina, povećava lučenje kemokina CCL2, CCL5, CXCL8, CKCL9, inducira ekspresiju CAMs (ICAM-1, VCAM-1, MCAM, E i P selektina), indukcija sinteze citokinskih receptora
Citokin IFN-γ	aktivirani leukociti	BBB-ECs, periciti, astrociti	lučenje kemokina CCL2, CCL5, CXCL8, CKCL9, ekspresija CAMs, indukcija sinteze citokinskih receptora
Citokin onkostatin M	aktivirani leukociti, aktivirani mikroglija i astrociti	BBB-ECs	lučenje IL-6, kemokina CCL2, ekspresija ICAM-1
		mikroglija	lučenje TNF- α i inducibilna sinteza dušikovog oksida (NO)
Citokin IL-17A	aktivirani T _H 17 limfociti	BBB-ECs	lučenje IL-6, kemokina CCL2, CXCL8, aktivacija NADPH oksidaze (sinteza ROS), smanjenje ekspresije TJ proteina
		mikroglija	lučenje IL-6, kemokina CCL2
		astrociti	lučenje IL-6, IL-1 α , IL-12, kemokina CCL2 i drugi, sinteza dušikova oksida
Citokin IL-1α	makrofagi	BBB-ECs	smanjenje ekspresije TJ proteina, proliferacija endotelnih stanica
Reaktivni kisikovi i dušikovi radikali (ROS, RNS)	aktivirani leukociti, aktivirani mikroglija i astrociti	BBB-ECs	oštetiti TJ proteina, inducira ekspresiju CAMs (ICAM-1, VCAM-1)
		oligodendrociti	indukcija apoptoze i demijelinizacije
Matriks metaloproteinaze	aktivirani leukociti, aktivirani mikroglija	BBB-ECs	razgradnja TJ proteina, indukcija kemokina, citokina i CAMs

(Preuzeto iz Larochelle i sur., 2011)

4.2. Mehanizam ozljede neurona i aksona u MS

U kompleksnoj bolesti kao što je MS više mehanizama djeluje, u manjoj ili većoj mjeri, na neurodegenerativno oštećenje. Iako je fokus stavljen na MS kao demijelinizacijsku bolest, u svim demijelinizacijskim lezijama - a i drugdje u neoštećenju bijeloj i sivoj tvari mozga osobe s aktivnom upalom - prisutno je oštećenje aksona i tijela neurona. Upravo zbog aksonske ozljede dolazi do trajne kliničke nesposobnosti oboljelog, odnosno progresivnog oblika bolesti. Uzimajući u obzir različite načine na koje bi imunosne stanice infiltrirane u mozak mogle prouzročiti aksonsku ozljedu (Slika 3), smatra se da ipak najveći ulogu u tome imaju aktivirani makrofagi i mikroglija stanice budući da se redovito mogu otkriti u neposrednoj blizini ozljeđenih aksona (Lassmann, 2010). Aktivirani makrofagi i mikroglija luče brojne citotoksične molekule, među njima kisikove i dušikove radikale koji su odgovorni za intenzivnu oksidativnu štetu proteina, lipida i DNA u oligodendrocitima i neuronima (Haider i sur., 2011). Budući da je otkriven i poremećaj funkcije mitohondrija u lezijama, smatra se da bi mehanizam ozljede aksona mogao biti slijedeći: oksidacija osjetljivih mitohondrijskih proteina dovodi do mitohondrijske disfunkcije s posljedicom nedostatka ATP-a što uzrokuje nenormalnu raspodjelu iona izvan i unutar stanice koja se normalno održava pomoću pumpi za čiji je rad potreban ATP. Stoga, dolazi do povišenja unutarstaničnog Ca^{2+} što aktivira proteaze ovisne o kalciju koje cijepaju mikrotubule i neurofilamente što naposljetku dovodi do ugradnje nekih ionskih kanala na kriva mjesta - na primjer, Ca^{2+} kanali regulirani naponom postaju ugrađeni lokalno na aksonsku membranu umjesto u sinapsu što dodatno povećava unutarstaničnu koncentraciju Ca^{2+} s posljedicom propadanja aksona (Lassmann, 2010).

Ova saznanja govore o mogućem blagotvornom utjecaju MS antioksidansa, što bi svakako trebalo istražiti (podaci o takvoj terapiji još ne postoje).

5. ZAKLJUČAK

Uzimajući u obzir kompleksnost multiple skleroze - po pitanju uzroka, mehanizama oštećenja, posljedica simptoma i tijeka bolesti – mogu se razumjeti poteškoće u istraživanju pronalaska odgovarajućih terapija za oboljele. Jasno je da istraživanju multiple skleroze treba pridati s naglaskom na različitu manifestaciju bolesti u skupina oboljelih što bi povećalo vjerojatnost pronalaska uspješnog liječenja. Iako postoje lijekovi koji sprječavaju u nekim oboljelih daljnju progresiju bolesti, još uvijek ne postoji lijek koji bi je izliječio (zaustavio u progresivnoj fazi i vratio u stanje prije obolijevanja). Poteškoće predstavlja i nepotpuna primjenjivost saznanja dobivenih na pokusnom animalnom modelu multiple skleroze, budući da taj model ne odgovara u potpunosti ljudskoj multiploj sklerozi, ali je dosada ipak iznjedrio brojna korisna saznanja koja bi, uz daljnja istraživanja, mogla dovesti do primjenjivih neštetnih terapija. Strategija liječenja autoimunih bolesti nespecifičnom imunosupresivnom terapijom (npr. kortikosteroidima) je nezadovoljavajuća jer nije usmjerena na "problematicke" stanice, već suprimira cjelokupni imunološki sustav oboljelog. Dakle, meta liječenja bi svakako trebala biti neka točka u slijedu događaja od skretanja autoreaktivnih stanica na patogeni put što naglašava važnost znanja o mehanizmu tijeka bolesti, odnosno naglašava važnost znanstvenih istraživanja o ovoj temi.

6. LITERATURA

- Demarin V, Podobnik Šarkanji S, Supanac V, Baši V, Bosnar M, Blažini B. (2000) Kako živjeti s multiplom sklerozom. 3. izdanje, Duga Print, Zagreb
- Donati D, Jacobson S. (2002) Viruses and Multiple Sclerosis. U: Polymicrobial Diseases. Brogden KA, Guthmiller JM. (editors). ASM Press, Washington, D.C., pp. 99-120.
- Gold R, Linington C, Lassmann H. (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* **129**, 1953-1971. Review.
- Govarts C, Somers K, Hupperts, Stinissen P, Somers V. (2007) Exploring cDNA phage display for autoantibody profiling in serum of multiple sclerosis patients: Optimization of the selection procedure. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1109**, 372-384.
- Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, De Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivins AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL. (2007) Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *The New England Journal of Medicine* **357**, 851-862.
- Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Hoftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H. (2011) Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*, Article in Press.
- Ingwersen J, Aktas O, Kuery P, Kieseier B, Boyko A, Hartung HP. (2011) Fingolimod in multiple sclerosis: Mechanisms of action and clinical efficacy. *Clinical Immunology*, Article in Press. Review.
- Johnston RB, Joy JE. (2003) Multiple sclerosis: Current status and strategies for the future. 1st ed. National academy press, Washington, D.C.

Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. (2011) How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *FEBS Letters*, Article in Press. Review.

Lassmann H. (2010) Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: What have we learnt from animal models. *Experimental Neurology* **225**, 2-8. Review.

Lassmann H. (2005) Mechanisms of multiple sclerosis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* **2**, 447-452. Review.

Lucchinetti C, Bruck w, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. (2000) Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. *Annals of Neurology* **47**, 707-717.

Zepp J, Wu L, Li X. (2011) IL-17 receptor signaling and T helper 17-mediated autoimmune demyelinating disease. *Trends in Immunology* **32**, 232-239. Review.

<http://www.mult-sclerosis.org>

7. SAŽETAK

Multipla skleroza je upalna demijelinizacijska bolest središnjeg živčanog sustava (CNS-a) čija je glavna manifestacija nastanak lezija koje su rezultat gubitka mijelinske ovojnice oko aksona neurona, ali i oštećenja samih demijeliniziranih aksona. Lezije koje nastaju posljedica su djelovanja autoreaktivnih imunskih stanica koje se infiltriraju u mozak prelaze i krvno moždanu barijeru, zbog čega se multipla skleroza smatra autoimunom bolešću. Uzrok bolesti je nepoznat, no prevladava mišljenje da je uzrokovana s više mehanizama usobno neisključivih čimbenika, kao što su okolišni i infektivni čimbenici u genetski predisponiranim pojedincima u kojih dolazi do aktivacije postojećih autoreaktivnih pomagačkih limfocita T i njihovog posljednjeg patogenog djelovanja. Mnoga saznanja o mehanizmu nastanka oštećenja CNS-a u multiploj sklerozi dolaze iz istraživanja na animalnom modelu izazvane autoimunosti - eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa - koji ima brojne kliničke, neuropatološke i imunološke značajke multiple skleroze. Tako je pomoću tog modela pokazano da nakon ekspanzije autoreaktivnih T_H1 i / ili T_H17 limfocita u sekundarnim limfnim organima dolazi do njihovog probijanja krvno-moždane barijere izlučenjem proupalnih citokina i drugih topljivih čimbenika poput matriks metaloproteaza i reaktivnih radikala kisika. Također, stanice mozga aktivirane upalnim proizvodima infiltriraju ih leukocita također otpuštaju citokine koji dodatno pridonose novom ulasku leukocita iz krvi i probijanju barijere. Veliki broj aktiviranih T_H stanica i drugih proupalnih stanica migrira dublje u bijelu tvar mozga što rezultira nastankom upalne lezije, odnosno dolazi do demijelinizacije, ali i oštećenja aksona i oligodendrocita. Smatra se da najvažniju ulogu u ozljedi aksona, s posljednjim trajnim kliničkim deficitom, imaju aktivirani makrofagi i mikroglija stanice koje izlučuju kisikove i dušikove radikale koji su odgovorni za intenzivnu oksidativnu štetu u lezijama oboljelih. Još uvijek ne postoji zadovoljavajuća terapija oboljelih, a meta liječenja bi svakako trebala biti neka točka u slijedu događaja od skretanja autoreaktivnih stanica na patogeni put što naglašava važnost znanja o mehanizmu tijeka bolesti.

8. SUMMARY

Multiple sclerosis is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) whose main manifestation is the formation of lesions that result from the loss of myelin sheath around the axons of neurons and damage of axons themselves. Lesions arise as a result of action of autoreactive immune cells that infiltrate the brain crossing the blood brain barrier, which is why multiple sclerosis is considered an autoimmune disease. The cause of the disease is unknown but the prevailing opinion is that it is caused by a number of mutually non-exclusive factors, such as environmental and infectious factors in genetically predisposed individuals in whom an activation of existing autoreactive helper T lymphocytes happens with their subsequent pathogenic actions. Many insights about the mechanism of CNS damage in multiple sclerosis come from an animal model of induced autoimmunity - experimental autoimmune encephalomyelitis - which has many clinical, neuropathological and immunological features of multiple sclerosis. This model demonstrated that the activation and expansion of autoreactive T_H1 and / or T_H17 lymphocytes in secondary lymphoid organs leads to breaking of the blood-brain barrier by secretion of proinflammatory cytokines and other soluble factors such as matrix metalloproteinases and reactive oxygen species. Also, the brain cells activated by inflammatory products of the infiltrating white blood cells release cytokines that further contribute to the recruitment of leukocytes from the blood and breaking of the blood-brain barrier. A large number of activated T_H cells and other proinflammatory cells migrate deeper into the white matter of the brain, resulting in the appearance of inflammatory lesions in which demyelination and damage to axons and oligodendrocytes occur. It is believed that activated macrophages and microglia cells which secrete oxygen and nitrogen radicals have the greatest role in axonal injury, which results with permanent clinical deficit. There is still no satisfactory treatment of multiple sclerosis; the target for treatment should be a point in the sequence of events from the turn of autoreactive cells in the pathogenic way and that comprehension highlights the importance of knowledge about the underlying disease mechanism.